

Memoria Final del Proyecto EME-REEM 2023

TÍTULO: MECANISMOS FUNCIONALES EN LAS INTERACCIONES GEN-AMBIENTE EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE PRIMARIA PROGRESIVA: VIRUS EPSTEIN-BARR Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE RIESGO

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Andrea Raposo López-Pastor

INVESTIGADORES COLABORADORES

Elena Urcelay García, Roberto Álvarez-Lafuente, María Domínguez Mozo, Irene Gómez Delgado
M^a Ángel García Martínez, Adela González Jiménez

RESUMEN

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren diferencias en la expresión de los genes *ZFP36L1* e *IKZF3* entre pacientes con diferentes formas clínicas de esclerosis múltiple (EM). En linfocitos aislados de pacientes con EM primaria progresiva (PP) se observaron niveles de expresión más bajos de ambos genes comparados con controles, mientras que los de pacientes remitente-recurrentes (RR) mostraron niveles similares a controles. Tras la estimulación celular, los pacientes PP mostraron una activación inmunitaria reducida en comparación con controles, mientras que no se observaron diferencias significativas en los RR. Además, se encontraron diferencias en la proliferación celular: los pacientes PP tendieron a una mayor proliferación basal, pero una menor respuesta tras la estimulación en comparación con controles. Los análisis genotípicos revelaron asociaciones entre polimorfismos en los genes *ZFP36L1* e *IKZF3* y los niveles de activación y proliferación celular, indicando que estos genes podrían desempeñar un papel clave en la regulación inmunitaria en la EM.

OBJETIVOS INICIALMENTE PLANTEADOS EN EL ESTUDIO

Según lo planteado en la solicitud del proyecto, se han seleccionado *in silico* las variantes de interés por su ubicación y tras valorar la potencia estadística atendiendo a la frecuencia del alelo minoritario. Por tanto, el objetivo principal del estudio es analizar los mecanismos subyacentes a los polimorfismos de riesgo rs12946510 en el gen *IKZF3* y rs2236262 en *ZFP36L1*, en pacientes de EM y controles, con especial interés en el estudio diferenciado de la forma clínica primaria progresiva, PP. Como objetivo secundario se plantea estudiar las posibles divergencias funcionales entre pacientes PP y RR que expliquen el curso diferente de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

El gen *ZFP36L1* pertenece a una familia de factores de transcripción críticos para la regulación de la homeostasis de las células T, ya que están implicados en varios procesos clave como la muerte celular, la reprogramación metabólica y el ciclo celular¹. Se ha descrito que este gen tiene un papel fundamental en la inducción de la autofagia, un proceso vital para la adaptación al estrés². En otro estudio, se destacó el papel del gen *ZFP36L1* en la supresión de mediadores inflamatorios, lo que sugiere un papel antiinflamatorio y de mantenimiento de la homeostasis celular. Además, se ha visto su relación con otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad celiaca, la enfermedad de Crohn o la artritis reumatoide^{3,4}. En el caso de la EM, se ha descrito que el alelo de riesgo a padecer la enfermedad es el A (alelo minoritario con un 49% de frecuencia en la población europea)⁵.

Por otro lado, el gen *IKZF3*, que codifica la proteína Aiolos, es un miembro de la familia de los factores de transcripción de los dedos de Zinc IKAROS. Este gen tiene un papel en la activación del sistema inmunitario, dado que regula la apoptosis de células T y se encuentra implicado en la función y diferenciación de múltiples subconjuntos de células Th^{6,7}. Además, se ha visto también su papel en otras enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide^{8,9}. Con respecto a la EM, se ha descrito que el alelo de riesgo es el T (alelo minoritario con un 47% de frecuencia en la población europea)¹⁰.

RESULTADOS

1. Selección Pacientes y Genotipado

Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron PBMCs de pacientes de esclerosis múltiple (EM) tratados con Ocrelizumab y/o Rituximab, así como de controles sanos (**Tabla 1**) de los cuales teníamos ADN para el genotipado de los SNPs, rs12946510 en *IKZF3* y rs2236262 en *ZFP36L1*. El alelo mayoritario del gen *IKZF3* es el C, con una frecuencia del 53% y el minoritario el T, con el 47%; en el gen *ZFP36L1* el alelo mayoritario es el G con 56% y el minoritario el A con el 44%.

Tabla 1. Características de los individuos reclutados en el estudio. Se representa la media de las variables y su desviación estándar correspondiente entre paréntesis.

FORMA CLÍNICA	N	% Mujeres	EDAD (años)	<i>ZFP36L1</i> (% GG)	<i>IKZF3</i> (% CC)	TRATAMIENTO		EDSS
						OCRELIZUMAB	RITUXIMAB	
CONTROL	19	52.6	48 (±12.61)	36.8	42.1	-	-	-
EMPP	19	33.3	52 (±10.81)	29.4	35.3	14	5	5.5 (±2.75)
EMRR	17	58.8	42 (±7.31)	41.2	31.3	10	7	2.4 (±1.98)

2. Diferencias en los niveles de expresión de RNAm de los genes

El grupo de pacientes PP exhibe niveles de expresión más bajos tanto para el gen *ZFP36L1* como para *IKZF3*, en comparación con los controles, mientras que los pacientes RR presentan niveles intermedios (**Figura 1A**).

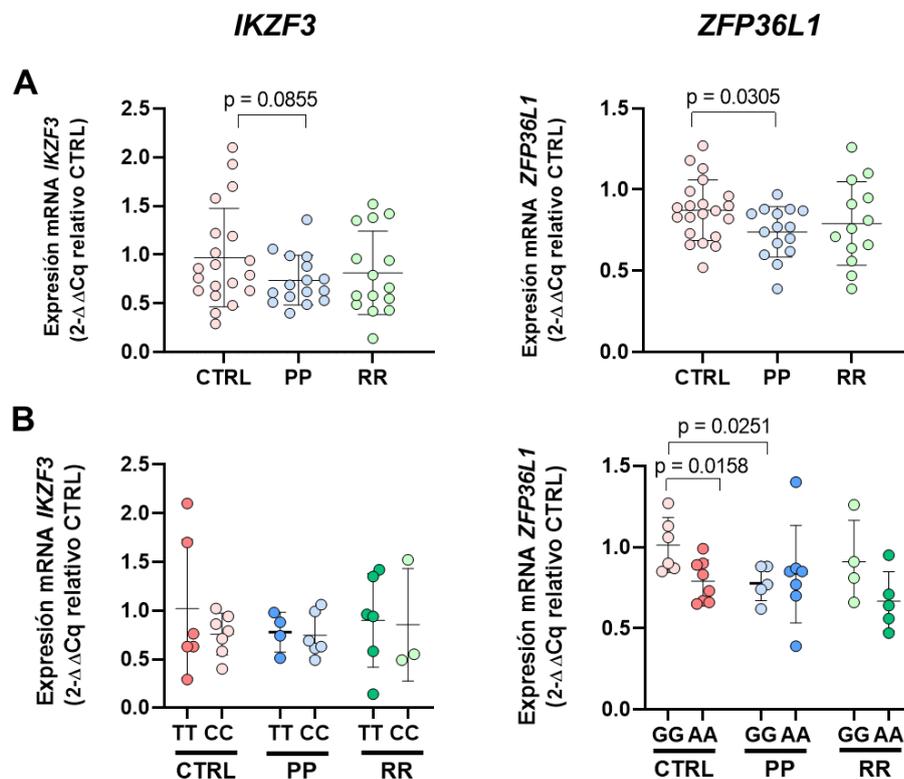


Figura 1. Niveles relativos de mRNA de *IKZF3* y *ZFP36L1* en pacientes y controles. A) Comparación de los niveles relativos de expresión entre las distintas formas clínicas y los controles. B) Niveles de expresión según genotipo. Los datos se representan en diagramas de dispersión como media \pm desviación estándar. Dado que los polimorfismos en estudio han sido previamente descritos como *eQTL*, se decidió corroborar su efecto en la expresión del ARN mensajero realizando la comparación entre individuos homocigotos para cada alelo, entre quienes se esperarían las mayores diferencias.

En lo que respecta al gen *IKZF3*, a pesar de estar descrito como *eQTL*, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos, ni en controles ni en pacientes con EM. En el caso del gen *ZFP36L1*, en los controles los niveles de expresión en homocigotos para el alelo mayoritario (GG) son significativamente más altos en comparación con homocigotos para el alelo minoritario (AA). En los pacientes RR se observa un patrón similar, aunque las diferencias no alcanzan significación estadística debido al reducido tamaño de la muestra. En los pacientes PP no se evidencian diferencias entre los genotipos. (**Figura 1B**).

3. Activación linfocitaria

Tras la evaluación del marcador de activación linfocitaria temprana, CD69⁺, en las distintas subpoblaciones linfocitarias, no se observaron diferencias significativas en estado basal.

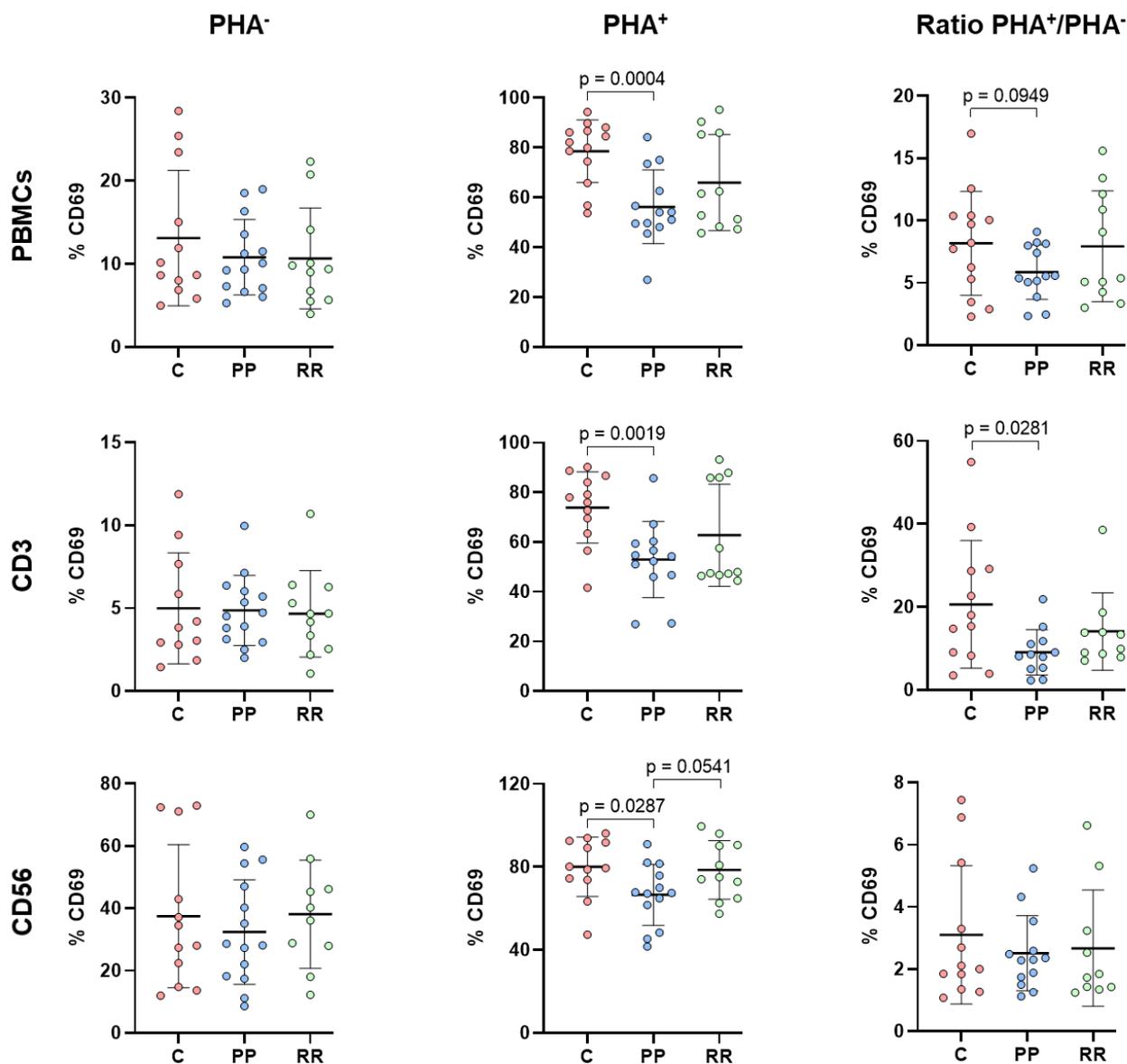


Figura 2. Detección de la activación linfocitaria temprana. Porcentaje de células CD69⁺ antes y después de la estimulación con PHA, así como el ratio PHA⁺ / PHA⁻ en PBMCs, células CD3⁺ y CD56⁺, tanto en controles (C) como pacientes PP y RR. Los datos se representan en diagramas de dispersión como media \pm desviación estándar.

No obstante, tras la estimulación con PHA se evidenció una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de células CD69⁺, por tanto una menor activación, al comparar a los

pacientes PP con los controles en las diversas subpoblaciones estudiadas. No se detectaron diferencias al comparar los pacientes RR con controles. Esta disminución también fue observada al analizar el ratio PHA⁺/PHA⁻ en PBMCs y CD3. (**Figura 2**).

A continuación se presentan los resultados del análisis en el cual los individuos se clasificaron según genotipos para los polimorfismos rs2236262 del gen *ZFP36L1* (**Figura 3A**) y rs12946510 del gen *IKZF3* (**Figura 3B**).

Con respecto a la activación linfocitaria temprana según el polimorfismo del gen *IKZF3* (**Figura 3B**), no se observaron diferencias entre los genotipos en ninguno de los grupos experimentales en estado basal. Sin embargo, tras la estimulación se observó una menor activación en PBMCs y en la subpoblación CD3⁺ de los pacientes PP homocigotos TT en comparación con los homocigotos CC.

En lo que respecta al polimorfismo del gen *ZFP36L1* y la activación temprana medida por la expresión de CD69 (**Figura 3A**), el genotipo mayoritario GG mostró niveles más altos de activación en comparación con el AA en controles y en pacientes RR, tanto en PBMCs totales como en la subpoblación CD56⁺ en estado basal.

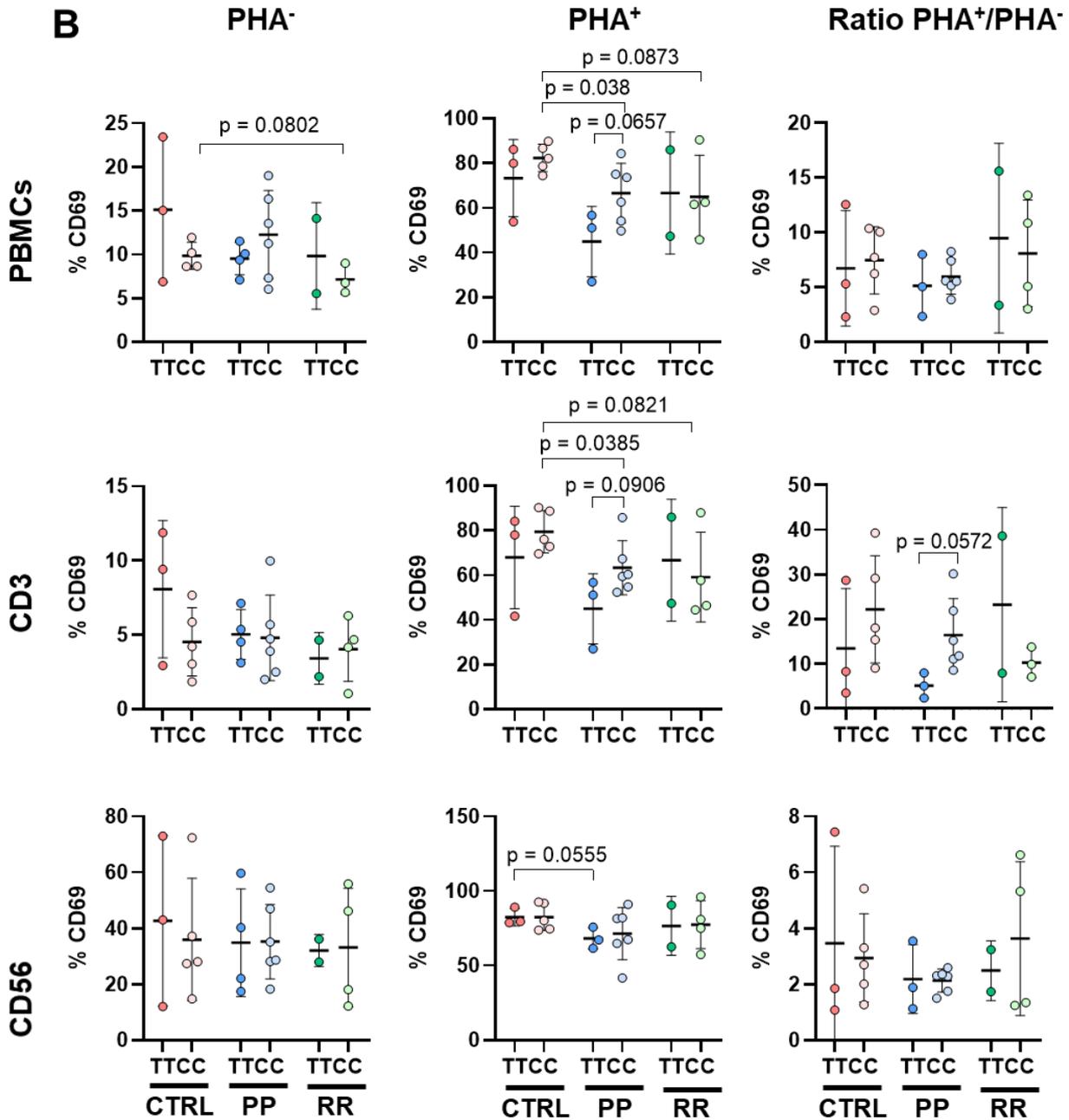


Figura 3B. Detección de la activación linfocitaria temprana atendiendo al genotipo de *IKZF3*. Porcentaje de células CD69⁺ antes y después de la estimulación con PHA, así como el ratio entre PHA⁺ y PHA⁻, en PBMCs, células CD3⁺ y CD56⁺, tanto en controles (C) como en pacientes PP y RR. Los datos se representan en diagramas de dispersión como media \pm desviación estándar

En cuanto al análisis del marcador de activación tardía CD25⁺ (**Figura 4**), no se observaron diferencias significativas entre las distintas subpoblaciones linfocitarias en estado basal. Tras la estimulación con PHA, se detectó una disminución significativa en el porcentaje de células activadas en los pacientes PP y RR en comparación con los controles, tanto en las PBMCs como en la subpoblación CD3⁺. Al normalizar los datos de cada individuo mediante el ratio PHA⁺/PHA⁻ se observó un menor incremento en la expresión del marcador de activación tardía en PBMCs y CD3⁺ de los pacientes PP y RR en comparación con los controles, alcanzando significación estadística en la subpoblación CD3⁺. Curiosamente, en las células CD56⁺ se observó una tendencia opuesta.

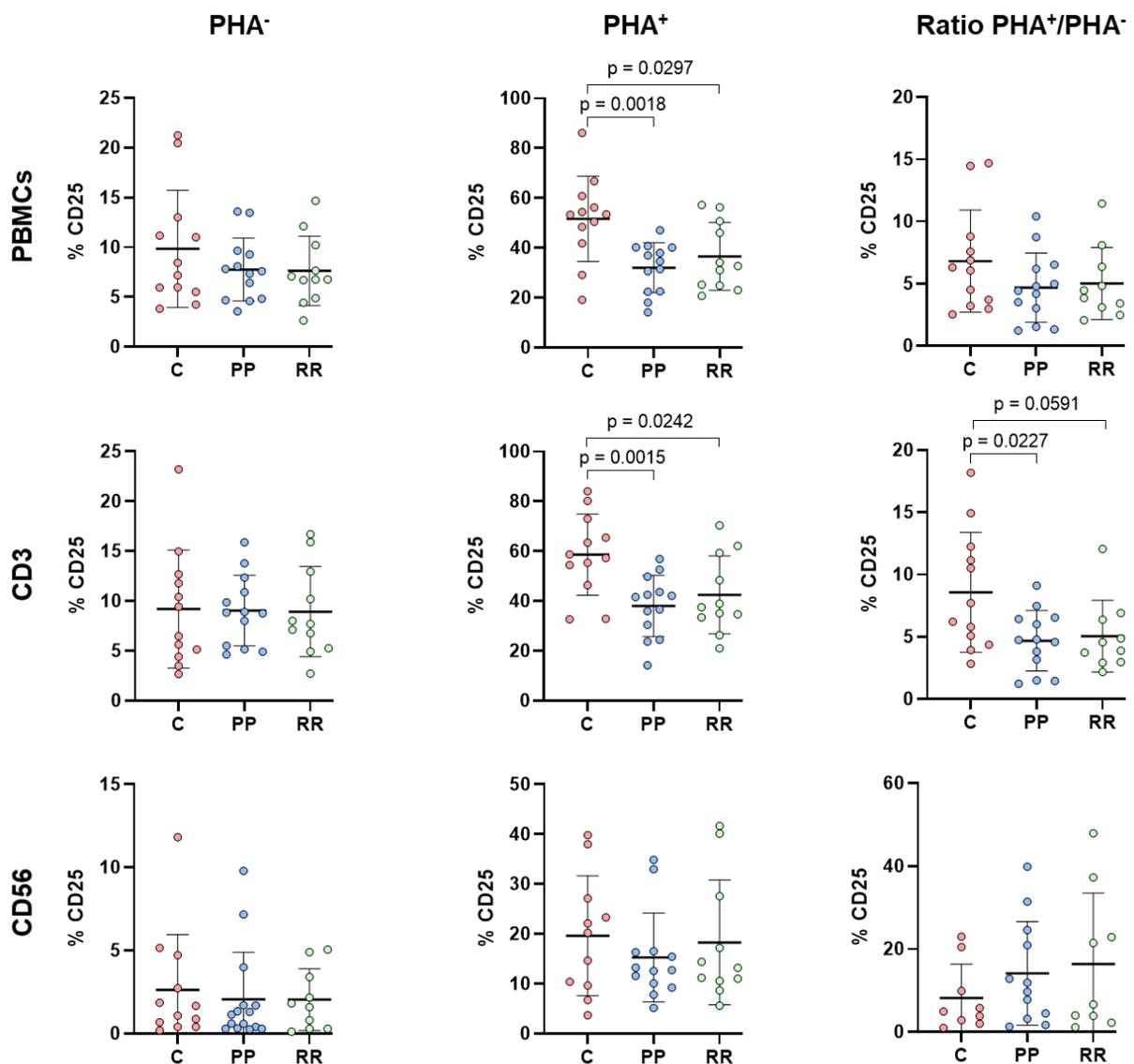


Figura 4. Detección de activación linfocitaria tardía. Porcentaje de células CD25⁺ antes y después de la estimulación con PHA, así como el ratio PHA⁺/PHA⁻, en PBMCs, células CD3⁺ y CD56⁺, tanto en controles (C) como pacientes PP y RR. Los datos se representan en diagramas de dispersión como media ± desviación estándar.

Al analizar los niveles de CD25⁺ según los polimorfismos estudiados no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos del gen *ZFP36L1*, ni en estado basal ni tras la estimulación. Sin embargo, para el gen *IKZF3* se detectaron diferencias al comparar el ratio PHA⁺/PHA⁻ entre los controles y los pacientes PP, pero no en los RR. En los controles, los individuos homocigotos TT presentaron un mayor incremento en el porcentaje de células CD25⁺ tras la estimulación que los homocigotos CC; mientras que en los pacientes PP, los homocigotos CC mostraron un mayor incremento (Figura 5).

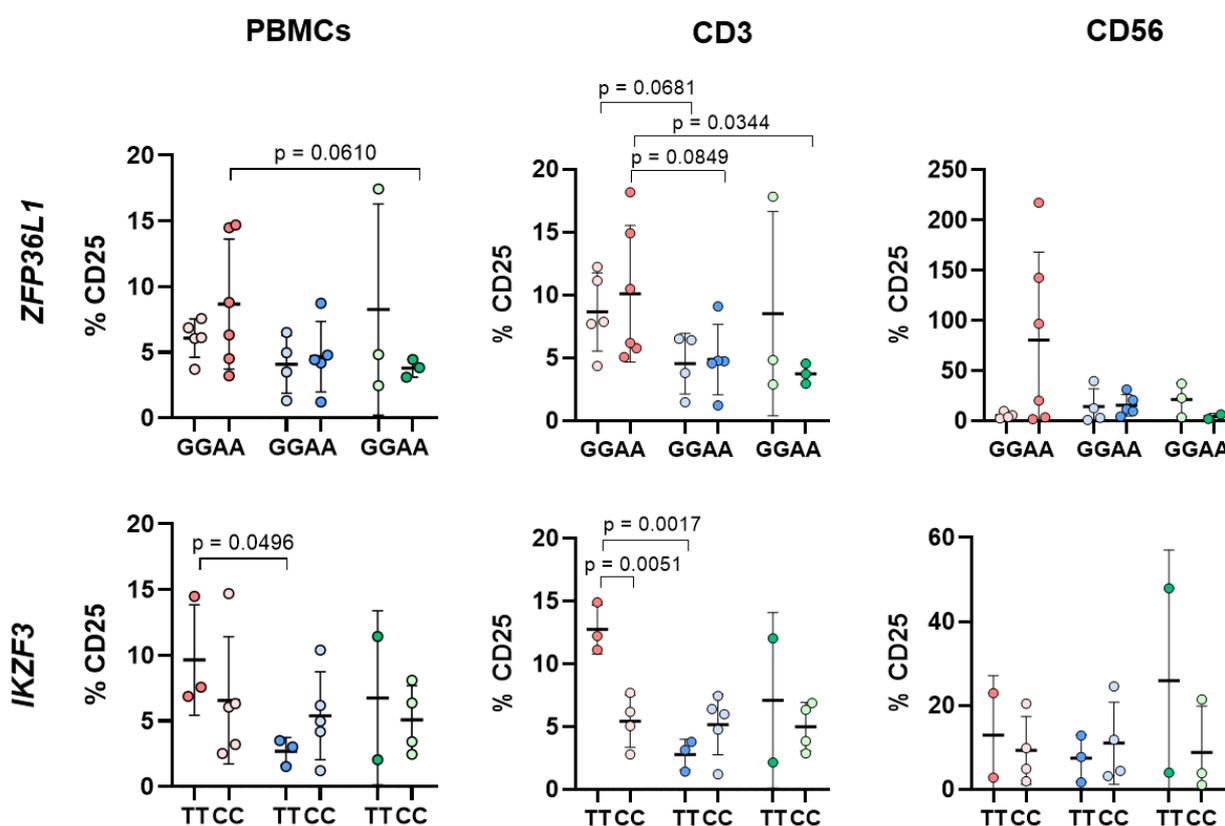


Figura 5. Ratio PHA⁺/PHA⁻ de la activación linfocitaria tardía según genotipos. En PBMCs, células CD3⁺ y CD56⁺, tanto en controles (rojo) como pacientes PP (azul) y RR (verde). Los datos se representan en diagramas de dispersión como media \pm desviación estándar.

4. Estudios mitocondriales: masa, contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) y despolarización de membrana

La evaluación de la masa mitocondrial reveló que las PBMCs en estado basal de los pacientes RR presentaron una reducción estadísticamente significativa en comparación con los controles y los pacientes PP, lo cual también fue evidente en las subpoblaciones CD3⁺ y CD56⁺ (Figura 6A).

En la **Figura 6B** se analiza la masa mitocondrial en función del polimorfismo de *ZFP36L1* y se observó que los controles con genotipo AA presentaron una reducción significativa de la masa mitocondrial en estado basal en todas las poblaciones linfocitarias, en comparación con los controles con genotipo GG. En cambio, en los pacientes PP, el genotipo con mayor masa mitocondrial fue el AA, mientras que en los RR no se encontraron diferencias por genotipo.

Finalmente, en relación con el polimorfismo del gen *IKZF3* (**Figura 6C**), los individuos con genotipo TT presentaron niveles más bajos que aquellos con genotipo CC, tanto en controles como en pacientes PP, mientras que en los pacientes RR no se observó esta tendencia.

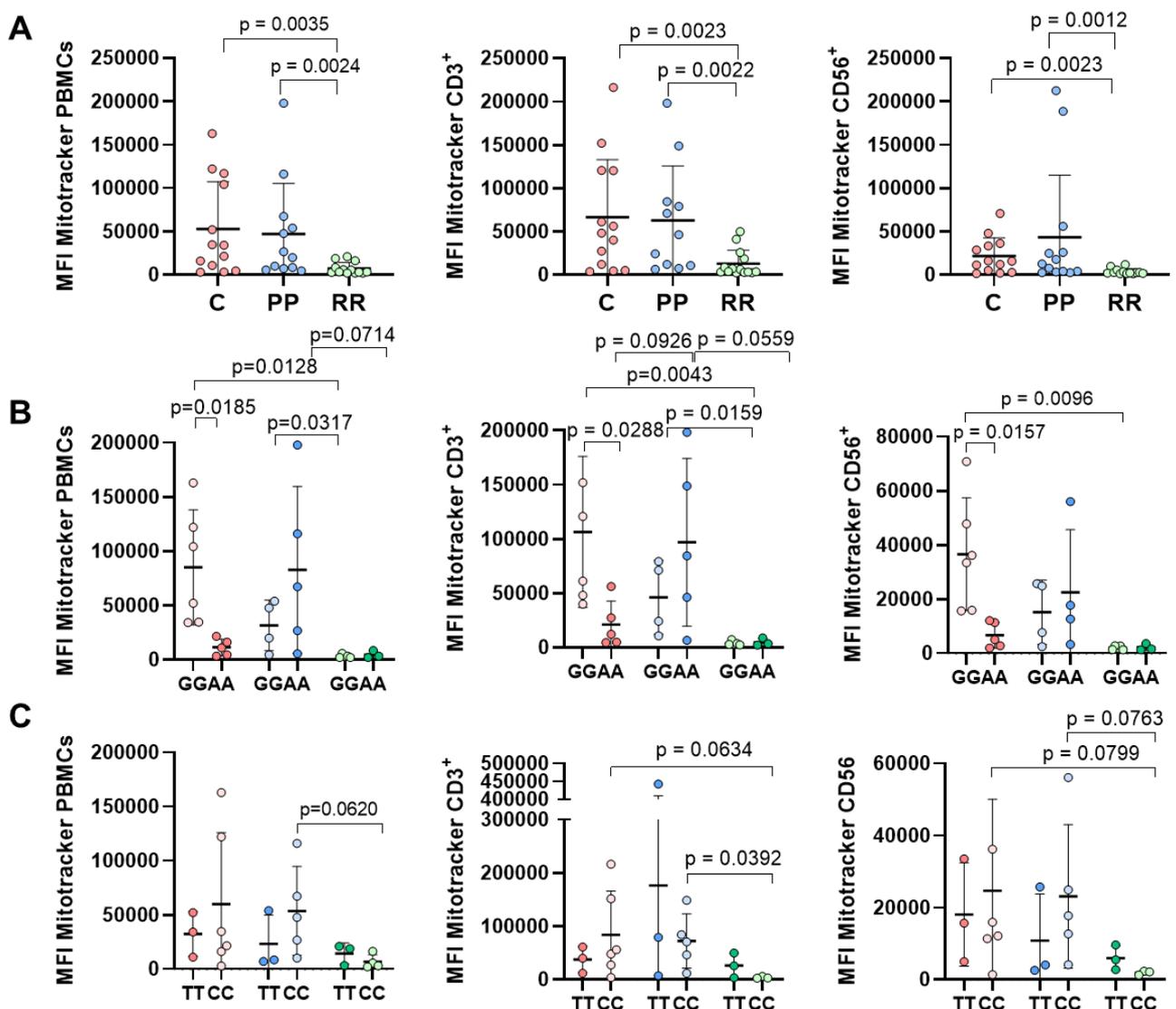


Figura 6. Diferencias en la masa mitocondrial. A) Entre las formas clínicas de los pacientes EM y controles; y atendiendo a los polimorfismos del gen *ZFP36L1* (B) y del gen *IKZF3* (C). Cantidad de masa mitocondrial medida por citometría de flujo en intensidad media de fluorescencia (MFI) en estado basal. Los datos se representan en diagramas de dispersión como media ± desviación estándar.

El análisis de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) evidenció una disminución no significativa en situación basal de las PBMCs de pacientes PP en comparación con controles, mientras que no se observaron diferencias con los pacientes RR. Cabe mencionar que tras la estimulación con PHA todos los grupos alcanzan niveles similares de ROS.

En relación al polimorfismo del gen *ZFP36L1*, en la situación basal se observó que en los controles no existen diferencias significativas entre genotipos mientras que en los pacientes PP y RR se evidenció una tendencia a que los individuos con el genotipo GG produjeran más ROS que aquellos con el genotipo AA. Sin embargo, tras la estimulación, los niveles se equipararon.

En lo que respecta al polimorfismo del gen *IKZF3* únicamente se identificaron diferencias no significativas tras la estimulación con PHA entre controles y pacientes PP, y se observó que el genotipo CC genera más ROS que el TT (**resultados no mostrados**).

La evaluación del potencial de membrana mitocondrial reveló una ligera disminución en la intensidad media de fluorescencia en los pacientes PP y RR en todas las subpoblaciones celulares, siendo más pronunciada la subpoblación CD56⁺, tanto en estado basal como tras la estimulación. Esto sugiere una mayor despolarización de la membrana mitocondrial (**resultados no mostrados**).

5. Estudio de poblaciones celulares y proliferación

La proliferación celular se evaluó mediante la expresión del marcador Ki67. En estado basal los pacientes PP muestran una tendencia a una mayor proliferación que los controles en todas las subpoblaciones celulares estudiadas, excepto la CD56⁺ (**Figura 7A**). No se apreciaron diferencias significativas con los pacientes RR. Tras la estimulación con PHA, los controles presentaron un aumento significativo en el porcentaje de proliferación en comparación con los pacientes PP y RR. Al analizar el polimorfismo del gen *ZFP36L1* (**Figura 7B**), no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos en estado basal en ninguno de los grupos experimentales. Tras la estimulación, el genotipo GG mostró una mayor proliferación en comparación con el genotipo AA, siendo estas diferencias más evidentes en la subpoblación CD8⁺ de los pacientes PP y en la subpoblación CD56⁺ de los controles.

Respecto al polimorfismo del gen *IKZF3* (**Figura 7C**), parece tener una mayor relevancia en la proliferación celular, especialmente en pacientes PP tras la estimulación, quienes mostraron diferencias significativas entre los genotipos. <De forma consistente, el genotipo TT presentó una mayor proliferación en todas las subpoblaciones celulares, excepto en la CD56⁺.

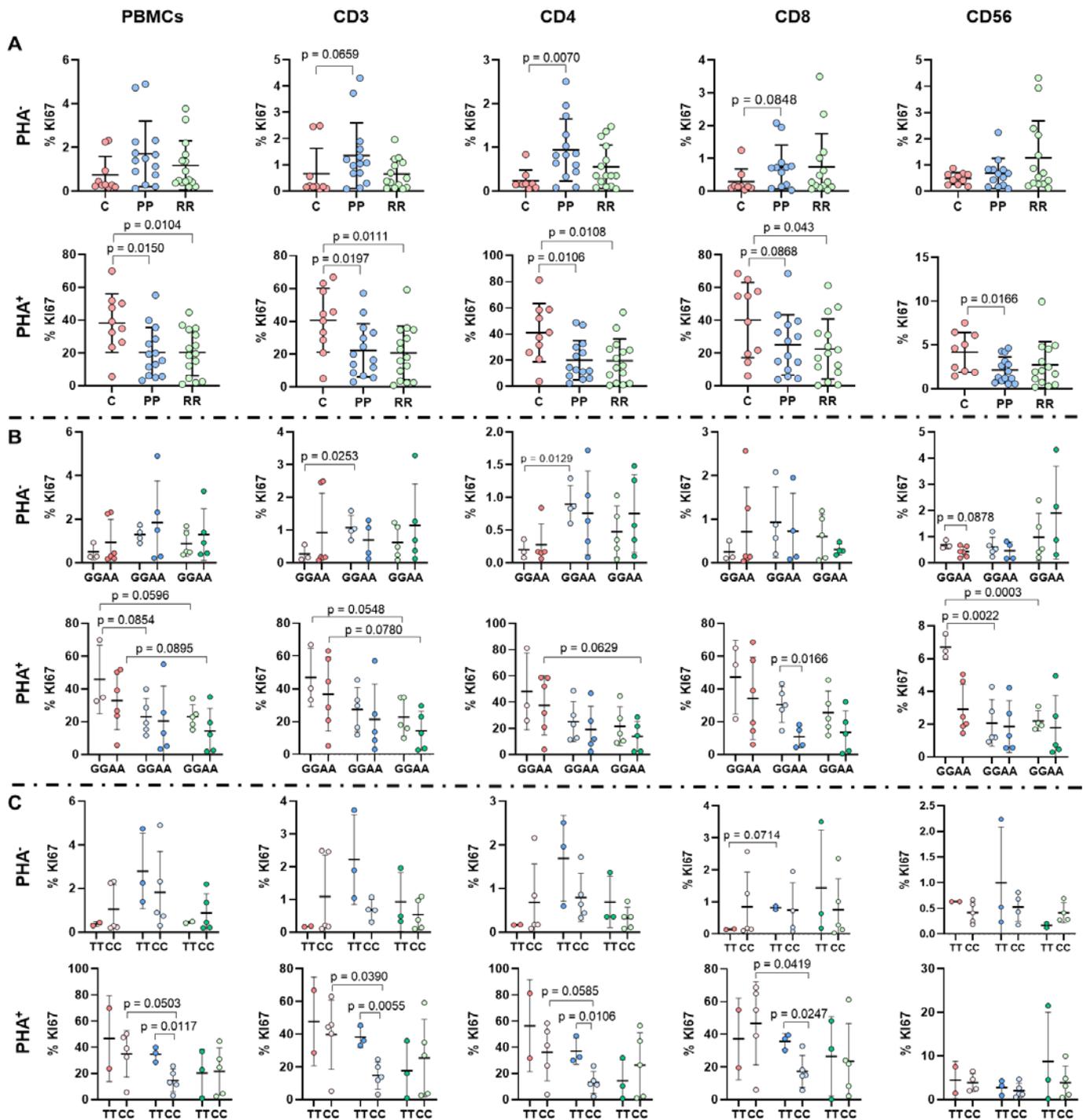


Figura 7. Proliferación celular en controles y formas clínicas de los pacientes de EM (A), y atendiendo al polimorfismo del gen *ZFP36L1* (B) y del gen *IKZF3* (C). Los datos de expresión de Ki67 se representan en diagramas de dispersión como media \pm desviación estándar.

Finalmente, se analizó el ratio PHA⁺/ PHA⁻ en relación con el porcentaje de las diferentes subpoblaciones efectoras y de memoria de las células CD4⁺ (**Figura 8A**) y CD8⁺ (**Figura 8B**).

Se observó un aumento significativo en el porcentaje de células CD4⁺ en los pacientes RR en comparación con los controles, mientras que en los pacientes PP se detectó un ligero incremento que no alcanzó significación estadística.

Tanto los pacientes RR como PP mostraron una leve disminución en el porcentaje de células CD4 efectoras y de células CD4 de memoria central, siendo esta disminución significativa en los pacientes RR.

En contraste, el porcentaje de células naive y células efectoras de memoria se encontró ligeramente incrementado en los pacientes en comparación con los controles.

Al enfocarnos en las subpoblaciones de células CD8⁺ no se encontraron diferencias significativas entre los controles y los pacientes, salvo en el porcentaje de células efectoras de memoria, donde los pacientes mostraron niveles superiores a los controles, con diferencias significativas observadas en los pacientes RR.

En cuanto al polimorfismo del gen *ZFP36L1*, en general no se detectaron diferencias significativas ni en pacientes ni en controles, excepto en los pacientes PP, donde los homocigotos GG presentaron un mayor porcentaje de *células CD4⁺ activadas* en comparación con los homocigotos AA. En el caso de las células CD8⁺, se observó un comportamiento similar, aunque en este caso las diferencias se presentaron en los controles, donde los homocigotos GG mostraron menores niveles de *células CD8⁺ activadas* en comparación con los homocigotos AA.

En relación con el polimorfismo del gen *IKZF3* no se encontraron diferencias significativas en las células CD4⁺, salvo en el porcentaje de *células activadas*, donde se observó una tendencia similar tanto en los controles como en los pacientes RR: los homocigotos TT presentaron menores niveles que los CC, mientras que en los pacientes PP se observó la tendencia opuesta. En las células CD8⁺ se observaron las mismas tendencias para las células activadas, además de diferencias en las células de memoria central, donde los pacientes PP y RR mostraron tendencias opuestas: en los pacientes PP, el genotipo TT presentó niveles más altos que el genotipo CC, mientras que en los pacientes RR ocurrió lo contrario.

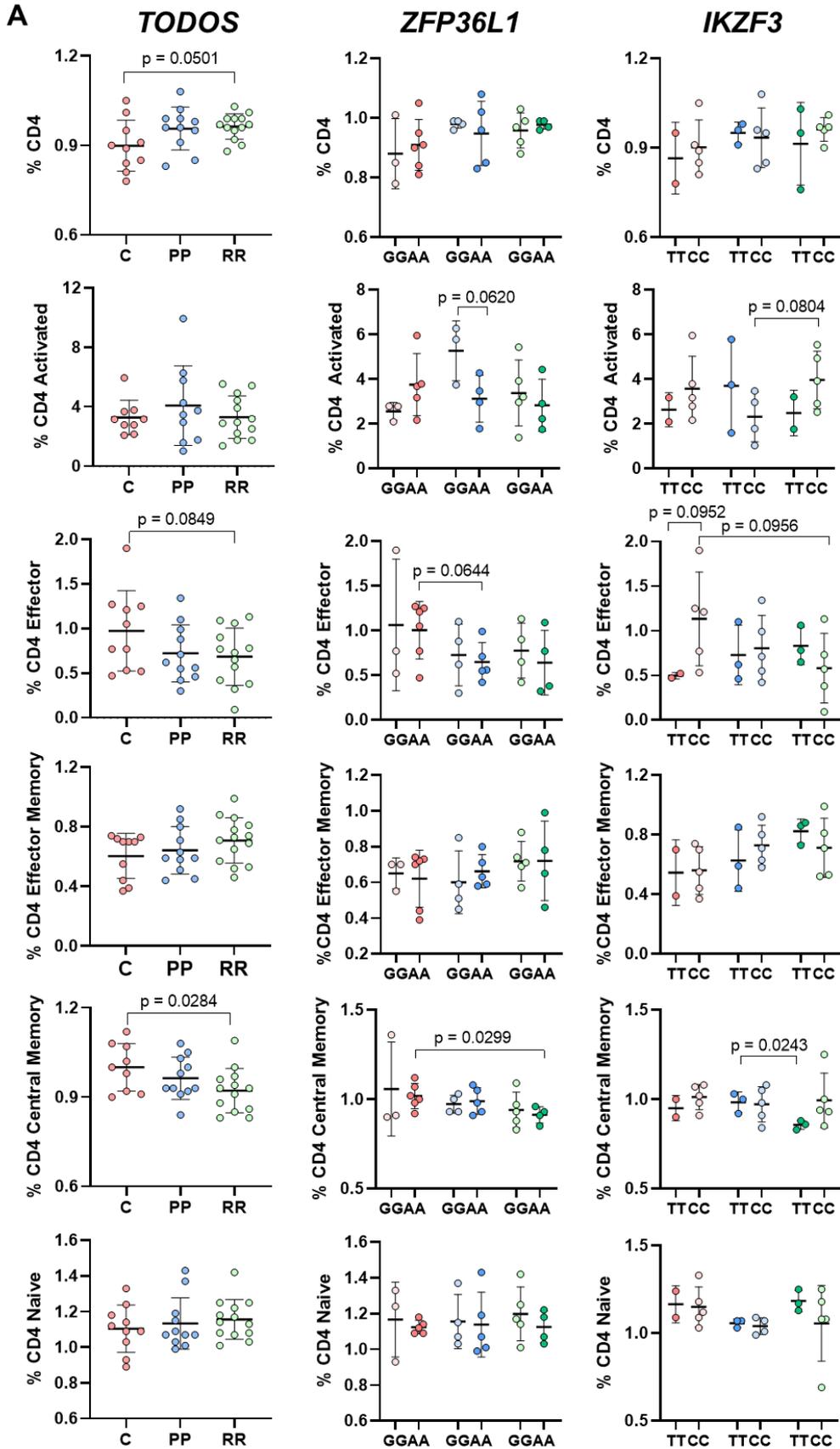


Figura 8A. Subpoblaciones celulares de CD4. Los datos del ratio PHA⁺/PHA⁻ se representan en diagramas de dispersión como media \pm desviación estándar.

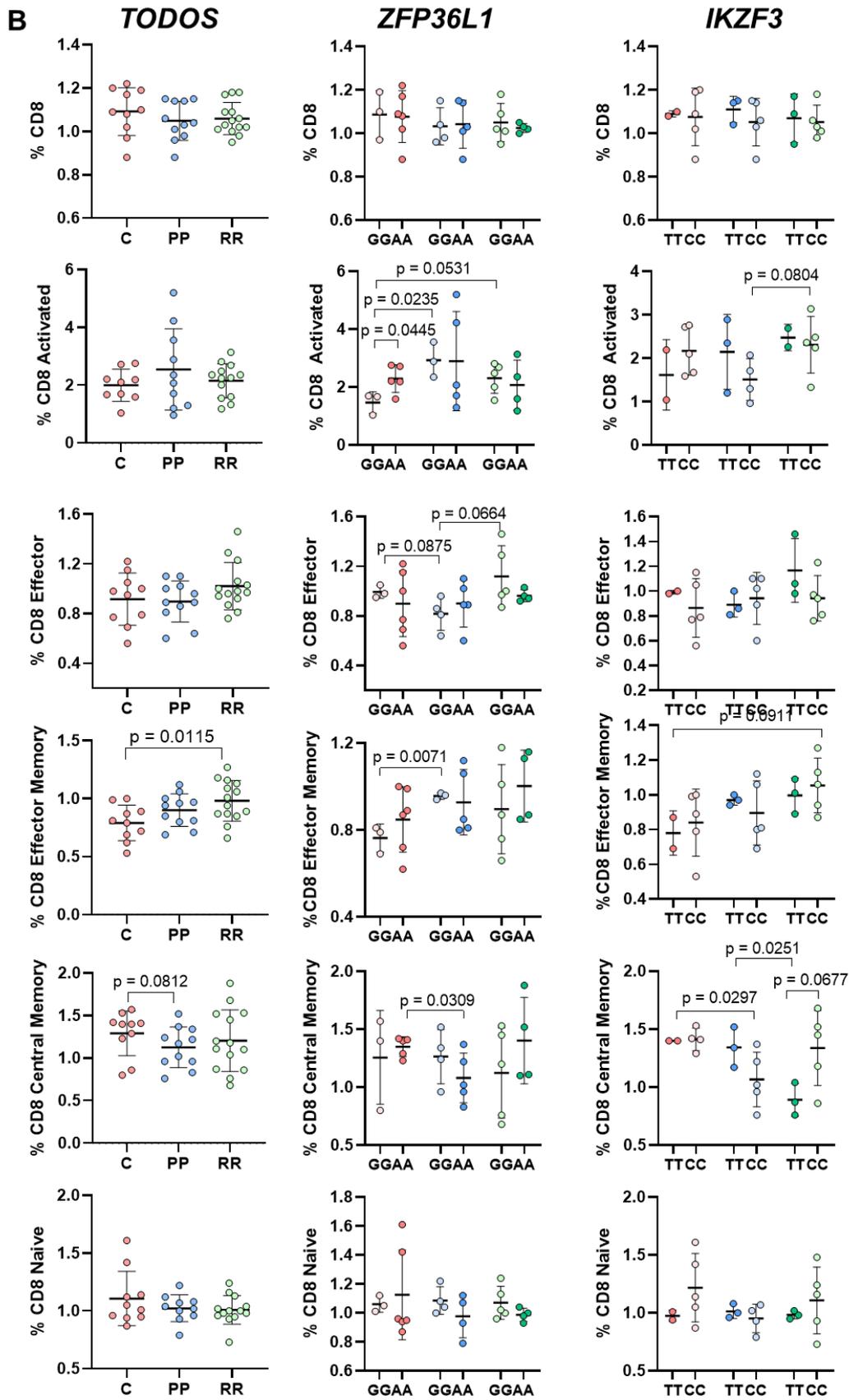


Figura 8B. Subpoblaciones celulares de CD8. Los datos del ratio PHA⁺/PHA⁻ se representan en diagramas de dispersión como media \pm desviación estándar.

6. Futuro

Los resultados obtenidos hasta el momento son alentadores y sugieren posibles asociaciones relevantes. Sin embargo, es fundamental incrementar el tamaño muestral con el fin de robustecer los hallazgos y alcanzar significancia estadística en las tendencias observadas dada la variabilidad que presentan los pacientes. Un tamaño muestral mayor permitirá compensar esta variabilidad de los datos y proporcionar una mayor precisión en la estimación de los efectos asociados a los polimorfismos estudiados.

Adicionalmente se encuentran en curso varios experimentos complementarios que tienen como objetivo profundizar en el análisis de estos polimorfismos y su potencial implicación en la patogénesis de la enfermedad. Estos experimentos no solo permitirán completar los análisis actuales, sino que también contribuirán a una comprensión más integral de los mecanismos moleculares subyacentes y su relevancia clínica.

Una vez concluidos los estudios, y con los resultados consolidados, tenemos previsto escribir sendos manuscritos para su publicación en revistas internacionales de alto impacto, dentro del primer cuartil, en los que se referenciará el apoyo otorgado en este proyecto.

7. Acciones Divulgativas

Para la difusión de este proyecto se ha participado en las jornadas divulgativas como la decimocuarta y decimoquinta noche europea de los investigadores y la semana de la ciencia 2023.

8. Bibliografía

1. Cook ME, Bradstreet TR, Webber AM, Kim J, Santeford A, Harris KM, et al. The ZFP36 family of RNA binding proteins regulates homeostatic and autoreactive T cell responses. *Sci Immunol*. 2022 Oct 1;7(76).
2. Shrestha A, Pun NT, Park PH. ZFP36L1 and AUF1 induction contribute to the suppression of inflammatory mediators expression by globular adiponectin via autophagy induction in macrophages. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018 Sep 1;26(5):446–57.
3. Makita S, Takatori H, Nakajima H. Post-Transcriptional Regulation of Immune Responses and Inflammatory Diseases by RNA-Binding ZFP36 Family Proteins. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
4. Perga S, Montarolo F, Martire S, Berchiolla P, Malucchi S, Bertolotto A. Anti-inflammatory genes associated with multiple sclerosis: A gene expression study. *J Neuroimmunol*. 2015;279(C):75–8.
5. rs2236262 (SNP) - Explore this variant - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 112. Disponible en: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=14:68794255-68795255;v=rs2236262;vdb=variation;vf=851688340.
6. Keshari PK, Harbo HF, Myhr KM, Aarseth JH, Bos SD, Berge T. Allelic imbalance of multiple sclerosis susceptibility genes IKZF3 and IQGAP1 in human peripheral blood. *BMC Genet*. 2016 Apr 14;17(1).
7. Stefanović M, Stojković L, Životić I, Dinčić E, Stanković A, Živković M. Expression levels of GSDMB and ORMDL3 are associated with relapsing-remitting multiple sclerosis and IKZF3 rs12946510 variant. *Heliyon*. 2024 Feb 15;10(3).

8. Dittrich-Salamon M, Meyer A, Yan S, Steinbach-Knodgen E, Kotschenreuther K, Stahl D, et al. Regulatory T Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis Are Characterized by Reduced Expression of Ikaros Zinc Finger Transcription Factors. *Cells*. 2022 Jul 1;11(14).
9. Kikuchi H, Yamashita K, Nakayama M, Toyonaga K, Tsuneyoshi I, Takasaki M, et al. Lacking of Aiolos accelerates premature B cell apoptosis mediated by BCR signaling through elevation in cytochrome c release. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2009 Jul;1793(7):1304–14.
10. rs12946510 (SNP) - Explore this variant - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 112. Disponible en: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=17:39755624-39756624;v=rs12946510;vdb=variation;vf=959776027.